

Отзыв официального оппонента на диссертационную работу

Кочетковой Елены Юрьевной

«Роль аутофагии в ответе Ras-экспрессирующих опухолевых клеток на действие киназных ингибиторов»

Представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук (специальность 03.03.04 – «клеточная биология, цитология, гистология»)

Актуальность и новизна работы:

Несмотря на прогресс в борьбе со злокачественными заболеваниями, опухоли, характеризующиеся онкогенными мутациями семейства малых ГТФаз Ras остаются одними из наиболее трудно поддающимися терапии. Сложность борьбы с Ras-экспрессирующими злокачественными клетками связана с активацией цитопротективных процессов, таких, как аутофагия, в ответ на действие противоопухолевых препаратов. Поэтому исследование Е.Ю. Кочетковой, посвященное разработке альтернативной стратегии элиминации Ras-трансформированных клеток, является актуальным и вносит существенный вклад в понимание этих процессов.

В исследовании Е.Ю. Кочетковой показано, что индукция клеточного старения делает Ras-экспрессирующие опухолевые клетки грызунов и человека чувствительными к киназному ингибитору MEK/ERK-пути, что позволяет предложить новую стратегию элиминации Ras-экспрессирующих клеток.

Научно-практическая значимость работы:

Диссертационная работа Е.Ю. Кочетковой носит фундаментальный характер, поскольку полученные результаты имеют существенное значение для понимания роли аутофагии в поддержании жизнеспособности Ras трансформированных опухолевых клеток при действии противоопухолевых агентов. В работе показана уникальная чувствительность индуцированных к старению Ras-трансформированных клеток к действию киназного ингибитора MEK/ERK-пути. Полученные данные позволяют предложить существенно новую стратегию борьбы с Ras-трансформированными клетками, способными приобретать толерантность к противоопухолевым ингибиторам за счет

аутофагии, что может иметь практическое значение для разработки противоопухолевой терапии.

Общая характеристика работы:

Диссертация Е.Ю. Кочетковой изложена на 149 страницах, построена по классическому плану и включает следующие главы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение и выводы», «Список литературы», состоящий из 197 пунктов (196 на английском языке), и «Благодарности». Диссертация проиллюстрирована 36 рисунками.

Глава 1 «Введение» включает в себя традиционные подглавы «Цели и задачи», «Научная новизна», «теоретическое и практическое значение работы», «Апробации», «Личный вклад автора», «Финансовая поддержка», «Список опубликованных работ».

Глава «Обзор литературы» написана правильным научным языком и достаточно полно отражает современное состояние науки в области изучения трансформации клеток, механизмов аутофагии и внутриклеточных процессов, регулирующих выживаемость Ras-трансформированных опухолевых клеток. В данном разделе подробно описываются механизмы злокачественной трансформации клеток и роль Ras/Raf/MEK/ERK-каскада в данном процессе. Подробно описаны мишени малой ГТФазы Ras в опухолевой трансформации. Далее автор подробно описывает механизмы аутофагии, ее различные стадии и их регуляцию. Поскольку для Ras-трансформированных клеток крайне важным является процесс митофагии, так как жизнеспособность и туморогенность этих клеток непосредственно зависит от функционального состояния митохондрий, следующий подраздел обзора литературы посвящен критическому анализу данных по митофагии в опухолевых клетках. Поскольку роль аутофагии в канцерогенезе неоднозначно и на ранних этапах она может играть тумор-супрессорную роль, а на поздних этапах развития опухоли тумор-промотирующую роль, подробно описывается роль аутофагии в злокачественной трансформации клеток. Два основных механизма определяют регуляцию аутофагии в клетках. Активность mTOR киназы является основным запускающим механизмом аутофагии, тогда как при разрушении митохондрий или снижении уровня АТФ в клетке (в результате развития процессов аутофагии), происходит активация АМРК киназы, что приводит к подавлению активности mTOR киназы. В связи с этим, весьма актуальным является вопрос синтезирования ингибиторов mTOR киназы,

которые могут применяться при лечении онкологических больных. Далее приводятся данные по регуляции процессов клеточного старения, и роли этих процессов в норме и в канцерогенезе. Отмечается, что клеточное старение считается необратимой программой, изменение уровня питательных веществ не приводит к его отмене. В процессах старения наблюдается определенная взаимосвязь между активностью mTOR-киназы и процессами аутофагии, которые могут подавлять старение клеток. Достаточно обширная глава в обзоре литературы посвящена особенностям пространственной организации старых клеток. В ней приводится много интересных данных, однако, на мой взгляд, данный раздел можно было бы сильно сократить, без ущерба для изложения проблемы, поскольку многие результаты, приведённое в данном разделе, не имеют непосредственного отношения к работе автора. Исследования взаимосвязи процессов аутофагии и старения представляют большой интерес для понимания механизмов старения клеток. Исследования в данной области крайне противоречивы и результаты неоднозначно. Очевидно, что аутофагия может как способствовать процессам клеточного старения, так и препятствовать развитию данной программы. Поскольку данный вопрос имеет непосредственное отношение к работе автора, желательно было бы привести более подробные литературные данные. Далее в обзоре литературы описываются типы клеточной гибели и взаимоотношения аутофагической гибели и апоптоза. Отмечается, что аутофагия, которая исконно служит механизмом спасения клетки, может стать причиной ее гибели. Заканчивается обзор литературы небольшим заключением, который следовало бы представить в более обширном виде.

Главе «Материалы и методы» содержит описание большого количества использованных в работе экспериментальных подходов, таких, как: культивирование клеток грызунов и человека, трансфекция клеток грызунов, Вестерн-блоттинг, иммунофлуоресценция, проточная цитометрия, конфокальная и электронная микроскопия и многие другие. Необходимо отметить, что данный раздел написан чрезвычайно кратко. Автору следовало более подробно описать детали примененных методов. Раздел «3.2.21. Статистическая обработка» не соответствует правилам статистической обработки результатов.

Глава «Результаты» содержит подробное описание выполненных экспериментов. Ключевыми результатами диссертационной работы являются:

- Ras-трансформированные клетки приобретают толерантность к действию киназного ингибитора MEK/ERK-пути PD0325901 за счет активации

цитопротективной, AMPK-регулируемой аутофагии, удаляющей поврежденные в результате действия PD0325901 митохондрии;

- Индукция старения усиливает чувствительность Ras_трансформированных клеток к действию ингибитора MEK/ERK-пути, в результате чего клетки претерпевают гибель;

- Стареющие клетки не могут завершить процесс цитопротективной аутофагии в ответ на ингибирование MEK/ERK-пути в связи с пространственным разобщением аутофагосом и лизосом, а также перемещением онкогенного Ras в цитоплазму, где он, по всей видимости, не может выполнять антиапоптотические функции.

- Подавление активности комплекса mTORC1, являющегося негативным регулятором аутофагии, не восстанавливает аутофагию и жизнеспособность клеток при ингибировании MEK/ERK-пути;

- Активация цитопротективной аутофагии лежит в основе толерантности Ras-трансформированных клеток к рентгеновскому облучению, а ингибирование MEK/ERK-пути приводит к нарушению финальных стадий аутофагии и снижению жизнеспособности клеток.

- Индукция старения делает KRas-экспрессирующие клетки аденокарциномы легкого человека A549 также чувствительными к ингибитору MEK/ERK-пути, что говорит о том, что полученный результат не является уникальным для клеток ERas.

Главы «Обсуждение» и «Заключение» написаны четко и лаконично. В разделе обсуждение результатов проводится критический анализ полученных автором результатов и их сравнение с имеющимися литературными данными. Подчеркивается новизна многих полученных автором результатов, а также указывается, что некоторые данные подтверждают уже имеющиеся в литературе сведения, полученные на других моделях, что существенно дополняет представления о роли аутофагии в регуляции жизнедеятельности клетки. В главе заключение, на основании проведенных исследований, автор приходит к выводу, что применение MEK/ERK-ингибиторов одновременно с индукторами старения представляет перспективную стратегию элиминации Ras-экспрессирующих опухолевых клеток.

Замечания по работе: Нет никаких существенных замечаний по научной части работы, однако по оформлению диссертации очень много вопросов:

1. Методы. Написаны очень кратко и следовало их представить более расширенно с детальным описанием экспериментов. В частности, из раздела «Статистическая обработка» остается непонятным, каким критерием пользовались для установления уровня достоверности.
2. Подсчеты интенсивности полос на рисунках, где представлены результаты Вестерн блота. Приведенные цифры мало информативны, не понятно к чему они относятся. Не указано сколько блотов сканировали. Если только один, приведенный на рисунке, то они лишены смысла. В биологии нет понятия «больше/меньше» могут быть либо достоверные, либо недостоверные изменения. Некоторые блоты (рис. 26) низкого качества и не совсем понятно, как их можно было сканировать.
3. В блотах по Phospho-ERK1,2 референсом следовало бы использовать саму киназу, а не GAPDH, поскольку при длительном ингибировании, могла измениться ее экспрессия.
4. Некоторые иммунофлуоресцентные рисунки (3, 4, 12) не имеют обозначений (стрелки) не понятно, на что надо обращать внимание.

Высказанные замечания не влияют на общую положительную оценку работы и на её высокий научный уровень.

Автореферат полностью отражает основное содержание и выводы работы.

По теме диссертации автором было опубликовано 6 статей в рецензируемых научных журналах и 4 тезисов докладов. Результаты исследований докладывались на 7 конференциях, в том числе международных. Опубликованные работы отражают основные результаты, являющиеся предметом защиты.

Заключение:

Считаю, что по актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, объему проведенных исследований диссертационная работа Е.Ю. Кочетковой «Роль аутофагии в ответе Ras-экспрессирующих опухолевых клеток на действие киназных ингибиторов» выполненная под руководством Пospelовой Татьяны Викторовны является оригинальной, законченной научно-квалификационной работой, содержащей решение задачи, имеющей значение для развития соответствующей отрасли знаний, и полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» № 842 от 24 сентября 2013 года, предъявляемым к кандидатским

диссертациям, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации, а её автор, Кочеткова Елена Юрьевна, несомненно, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – «клеточная биология, цитология, гистология».

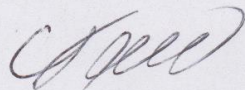
Главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук,

Доктор наук по специальности

03.03.01 – Физиология

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

20.02.2019



С.П. Гамбарян

Адрес: 194223, Российская Федерация, Санкт-Петербург, пр. Тореза, д. 44, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук.

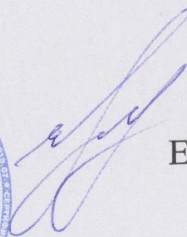
Телефон: +7-(921)-881-17-59

E-mail: gambaryan.stepan@gmail.com

Сайт: www.iephb.ru

Подпись д.б.н. С.П. Гамбаряна заверяю:

Ученый секретарь Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Института эволюционной физиологии
и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской академии наук



Е.И. Гальперина